



# ESTRATÉGIAS INOVADORAS PARA DESENVOLVER ALIMENTOS MAIS SAUDÁVEIS





# ESTRATÉGIAS INOVADORAS PARA DESENVOLVER ALIMENTOS MAIS SAUDÁVEIS

## FOODSME-HOP TECHNOLOGY BOOK

### EDITORAS

Manuela Vaz Velho, Susana Fonseca, Rita Pinheiro  
IPVC - Instituto Politécnico de Viana do Castelo



## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Programa de Cooperação Inter-regional do Espaço Sudoeste Europeu (Interreg SUDOE IVB) pelo financiamento do projeto FOODSME-HOP (SOE/P1/E299) do qual deriva o presente livro.

Agradece-se ao conjunto de parceiros do projeto FOODSME-HOP que tornaram possível a publicação deste documento assim como às empresas que colaboraram nos projetos de demonstração.

Um agradecimento especial para a Catalina Perez e Sofia Gkika pela sua ajuda na edição deste livro.

---

### ESTRATÉGIAS INOVADORAS PARA DESENVOLVER ALIMENTOS MAIS SAUDÁVEIS

© 2013 da edição original:

Capítulo 1: IPVC

Capítulo 2: ITERG

Capítulo 3: IRTA y AINIA

© 2013 da tradução para português:

Capítulo 2 / Capítulo 3

ADI, AINIA, IPVC, IRTA, ITERG, FUNDECYT-PCTEX, Agencia Andaluza del Conocimiento

**Editado por IPVC:**

Praça General Barbosa

4900-347 Viana do Castelo - Portugal

Tel: +351 258809610 - Fax: +351 258829065

**Coordenação editorial:**

blueBOARD

Còrsega 453, 1er 3a

08037 Barcelona

00 34 934 575 832

**Correção orto-tipográfica e de estilo:**

LACONIC SANS SCP

**Maquetação:**

Concepte Gràfic

ISBN 13: 978-84-940022-3-6.

Depósito legal: B.8974-2013

**Impresso em Espanha por:**

MEDIAactive

# CAPÍTULO 1

## BIOCONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS TRADICIONAIS POR ADIÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS E DAS SUAS BACTERIOCINAS

Jácome SL<sup>1</sup>, Todorov SD<sup>2</sup>, Fonseca SC<sup>1</sup>, Pinheiro R<sup>1</sup>, Guerreiro JS<sup>1</sup>, Monteiro V<sup>1</sup>, Fernandes P<sup>1</sup>, Noronha L<sup>3</sup>, Almeida G<sup>3</sup>, Gomes A M<sup>3</sup>, Pintado MM<sup>3</sup>, Silva CLM<sup>3</sup>, Morais AMMB<sup>3</sup>, Silva J<sup>3</sup>, Teixeira P<sup>3</sup>, Vaz Velho M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Tecnologia e Gestão – Instituto Politécnico de Viana do Castelo  
Avenida do Atlântico s/n, 4900-348 Viana do Castelo (Portugal)

<sup>2</sup>Departamento de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14, 05508-900 São Paulo (Brasil)

<sup>3</sup>Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto (Portugal)

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>10</b> |
| 1.1 Produtos alimentares tradicionais e desenvolvimento rural ....  | 10        |
| 1.2 Conservantes sintéticos em produtos curados fumados .....   | 10        |
| 1.3 Bioconservação de alimentos .....   | 12        |
| 1.3.1 As bactérias ácido-láticas .....  | 13        |
| 1.3.2 Metodologias e requisitos de aplicação das bactérias<br>ácido-láticas .....   | 15        |
| <b>2. ESTUDO DEMONSTRAÇÃO: SUBSTITUIÇÃO DE ADITIVOS<br/>SINTÉTICOS POR CULTURAS VIVAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS<br/>NUM PRODUTO CURADO/FUMADO TRADICIONAL .....</b> | <b>16</b> |
| 2.1 Definição do produto .....  | 16        |
| 2.2 Objetivos .....   | 17        |
| 2.3 Desenvolvimento experimental .....  | 18        |
| 2.4 Resultados .....  | 19        |
| <b>3. CONCLUSÕES .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>4. AGRADECIMENTOS .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>22</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 PRODUTOS ALIMENTARES TRADICIONAIS E DESENVOLVIMENTO RURAL

“  
**Numa época em que as fronteiras políticas e económicas estão desvanecidas, os elementos que marcam a diferença e identificam um alimento ganham uma importância especial, tanto para os produtores como para os consumidores.**  
 ”

Numa época em que as fronteiras políticas e económicas estão desvanecidas, elementos que diferenciam e identificam um produto ganham especial importância junto dos produtores e consumidores. Dentro de cada país os recursos locais, representados aqui pelos produtos alimentares tradicionais, podem ter um impacto económico considerável, mas para tal torna-se importante a criação de esquemas de produção e organização específicos que permitam explorar as diversidades e complementaridades dos vários sabores e saberes existentes, levando à obtenção de margens de lucro mais consideráveis [1].

A definição de produto tradicional não é fácil nem clara sendo alvo de várias interpretações de acordo com diferentes autores [2]. De acordo com alguns autores, produtos tradicionais são produtos únicos que resultam das matérias-primas e dos conhecimentos aplicados, dos usos, das práticas de produção, de distribuição, de consumo e das denominações de produto local, tradicional, artesanal ou regional [2]. Em sentido lato também são referidos como produtos tradicionais os produtos que se identificam pela sua origem geográfica, pelo processo de produção ou pelas características intrínsecas que os vinculam a um costume, modo de fazer, época e que por isso se diferenciam de outros [3].

Por outro lado a crescente tendência para o consumo de alimentos saudáveis e para a preferência de produtos com especificidades e origens determinadas, permite uma forte revalorização dos produtos tradicionais junto de nichos de consumo urbano. Desta forma, é fundamental que países do sudoeste europeu que apresentam um património importante de produtos agrícolas e agroalimentares, apostem na diferenciação dos mesmos, no aumento de valor, na preservação dos hábitos ancestrais e modos de produção, com o intuito de serem capazes de os transmitirem às gerações futuras e ao mesmo tempo obterem ganhos de produtividade consideráveis [4].

Os produtos fumados e curados à base de carne, principalmente de carne de porco, têm um enorme impacto na economia do sudoeste europeu. Face a isto, é importante desenvolverem-se novos conceitos e tecnologias que permitam aumentar o valor comercial deste produtos e, por sua vez, dinamizar o setor sem descurar os seus processos típicos de produção, a sua origem e as suas gentes.

Com exceção de alguns países em desenvolvimento, onde a cadeia de refrigeração não está amplamente estabelecida, hoje fumar ou curar um alimento tem como principal objetivo dotá-lo de características organoléticas diferenciadas de acordo com o modo de produção, a cultura gastronómica ou o território onde este é fabricado. Conferir ao produto curado/fumado um sabor característico, que seduza o consumidor, é hoje um dos principais objetivos da indústria tradicional. O efeito conservante destas técnicas é, nalguns casos, mínimo, mas o uso de aditivos químicos necessário para garantir a segurança microbiológica, pode afetar a segurança química do alimento [1].

### 1.2 CONSERVANTES SINTÉTICOS EM PRODUTOS CURADOS FUMADOS

Os aditivos são substâncias que se adicionam intencionalmente aos alimentos com um propósito tecnológico ou organolético, o que tem como resultado que tanto o próprio aditivo como os seus subprodutos se vão transformar num componente destes alimentos. Os aditivos não se consomem como alimentos nem se usam como ingredientes característicos na alimentação, independentemente de terem ou não valor nutritivo. A utilização destas substâncias tem uma longa história. Já os egípcios usavam corantes e aromatizantes e o uso de nitrato de potássio e de especiarias, com o objetivo de conservar e melhorar a aparência dos alimentos, remonta à época romana.

A utilização de aditivos na UE é regulada por legislação própria a nível europeu. Para que se possa utilizar um aditivo na indústria alimentar este deve fazer parte das listas fixadas no Anexo II do Regulamento da (CE) n.º 1129/2011[5], que serve de complemento ao Regulamento 1333/2008 [6]. Estas listas incluem todos os aditivos alimentares autorizados, especificidades/condições de utilização e teores máximos permitidos. A autorização para entrada no mercado de um novo aditivo é feita em base da demonstração da sua inocuidade para a saúde do consumidor. O Regulamento (CE) n.º 1331/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, estabelece um procedimento de autorização comum para os aditivos, as enzimas e os aromas alimentares. Portanto, todo aquele que desejar colocar no mercado um aditivo que não se encontre autorizado ou queira ampliar as condições de um aditivo autorizado deverá apresentar um requerimento de conformidade com este Regulamento assim como com a correspondente guia da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA).

Os aditivos alimentares são agentes importantes na medida em que favorecem a manutenção da qualidade e das características sensoriais dos produtos alimentares, contribuindo para a sua segurança/inocuidade, e para um aumento significativo do intervalo de consumo. Considera-se que os aditivos alimentares usados corretamente não colocam em risco a saúde dos consumidores, mas uma utilização abusiva destas substâncias, seja por aplicação de teores excessivos ou por inclusão de um aditivo não declarado/regulamentado, pode pôr em risco a segurança do consumidor.

No caso dos produtos cárneos curados e fumados a indústria recorre à utilização de nitratos, particularmente de potássio (E-252), durante a cura, para ver assegurada uma característica sensorial, de predominância cultural, típica nestes produtos, e para conservação pela inibição do crescimento de microrganismos patogénicos, nomeadamente a inativação de *Clostridium botulinum* e, por sua vez, da formação da sua toxina. A cor vermelha produzida origina-se por uma reação química entre o pigmento da carne a mioglobina (Mb) e o ião nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) resultante da transformação do ião nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) por ação de certos microrganismos durante o processo de cura [7]. O nitrito de sódio (E-250), normalmente utilizado juntamente com o nitrato de potássio pode apresentar certos riscos para a saúde do consumidor quando não se utiliza segundo as condições de aplicação do regulamento que assim o regula. Entre os principais riscos pode mencionar-se um efeito adverso relacionado com o transporte de oxigénio no sangue, pois o nitrito é capaz de unir-se à mioglobina do sangue da mesma forma que se une à mioglobina da carne, formando metahemoglobina, substância incapaz de transportar o oxigénio [7]. Outro risco é a formação de nitrosaminas, substâncias cancerígenas que se formam no alimento ou no próprio organismo. No primeiro caso o risco limita-se a produtos que sofrem altas temperaturas durante o seu processamento como é o caso do toucinho curado/fumado, ou que são ricos em aminas nitrosáveis como são o caso do pescado e de outros produtos fermentados. No segundo caso as nitrosaminas podem formar-se devido às condições ambientais do estômago e às reações entre o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e as aminas secundárias e terciárias resultantes da degradação da carne [1].

A quantidade inicial de nitritos e/ou nitratos adicionada durante o processo não é igual à quantidade encontrada no produto final pois são substâncias bastante instáveis e reativas o que conduz a uma redução significativa dos seus níveis antes do consumo. Para diminuição do risco de formação de nitrosaminas, para além da redução significativa do uso nitritos e nitratos, que defendemos, utilizam-se diversas técnicas como por exemplo a adição conjunta de nitratos com agentes que bloqueiam os mecanismos de formação das nitrosaminas. Estes agentes são o ácido ascórbico (E-330) e os seus derivados; o conjunto de tocoferóis alfa, gama e delta (E-306–E-309), especialmente eficazes em meios aquosos e gordos respetivamente. Nos EUA é obrigatória a adição conjunta de nitratos e ácido ascórbico durante o processo tecnológico. Com o mesmo objetivo a União Europeia impôs a obrigatoriedade, na adição nitrito de sódio, da adição conjunta de cloreto de sódio na mistura, no sentido de evitar intoxicações agudas por parte de consumidores assíduos deste tipo de produtos alimentares [7].



**A utilização de aditivos alimentares é regulada por uma legislação de âmbito europeu.**



O uso do açúcar como agente de cura é também importante muito embora as concentrações em torno dos 0,5 a 1,0 % não cheguem a ter uma ação conservativa, mas sim uma influência no sabor, proporcionando uma combinação de doce e salgado, suavizando o sabor derivado de especiarias e mascarando por vezes o sabor amargo dos nitritos [8]. Além desta primeira função do açúcar, existe uma segunda de igual importância, cujo significado é especial na produção de enchidos secos - servir de fonte de energia para as bactérias responsáveis pela redução dos nitratos, e posterior desenvolvimento das bactérias ácido-lácticas responsáveis pela diminuição do pH afetando indiretamente o processo de conservação destes produtos [8].

A adição de nitratos e nitritos a produtos cárneos curados e/ou fumados é uma decisão baseada na relação risco/benefício. Por um lado existe o risco de formação de nitrosaminas e da intoxicação pela sua ingestão excessiva mas por outro, o risco do não controlo do crescimento do *Clostridium botulinum* e da formação da toxina botulínica. Os organismos reguladores aceitam o uso de nitratos e nitritos considerando-os necessários para garantir a segurança microbiológica de certos alimentos, mas impondo limites de adição e teores máximos destes compostos e a utilização conjunta de inibidores da formação de nitrosaminas.

Em Portugal a adição de nitratos e nitritos não é utilizada na formulação de produtos cárneos com Denominação de Origem Protegida ou Indicação Geográfica Protegida. Somos de opinião que assim deverá continuar a ser, mas para isso é fundamental o estudo de tecnologias alternativas que permitam aumentar a segurança microbiológica, mantendo as características organolépticas do produto e o seu modo de produção tradicional.

### 1.3 BIOCONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Nas últimas décadas tem surgido uma forte procura de produtos naturais e os produtos tradicionais, sem aditivos químicos, têm vindo a adquirir maior interesse e atratividade para os consumidores. Os novos processos de fabrico e a constante procura por produtos minimamente processados obriga ao desenvolvimento de novas estratégias para prolongar a vida útil dos alimentos.

A bioconservação de alimentos, através da adição de substâncias naturais, apresenta-se como uma alternativa interessante para aumentar o tempo de prateleira, garantir a segurança microbiológica, reduzir o uso de aditivos sintéticos, mantendo as características sensoriais e nutricionais dos produtos perecíveis.

A bioconservação é uma técnica de conservação alimentar amplamente utilizada nos EUA, onde conta com a aprovação da FDA (Food and Drug Administration), não estando regulamentada pela legislação europeia [9].

Quando procuramos evidenciar as vantagens na utilização deste tipo de tecnologia podemos facilmente nomear as seguintes [9]:

- Apresentam-se como uma solução segura e com menos limitações do que os conservantes químicos, já que se produzem de forma natural na matriz de alimentos curados;
- Não são conhecidas resistências e o impacto ambiental é mínimo já que são rapidamente eliminadas pela cadeia alimentar;
- Possuem um espectro de ação muito definido; a sua atividade vê-se potenciada pelo pH e apresentam um efeito sinérgico com outros agentes metabólicos antimicrobianos;
- A sua utilização é compatível com a rotulagem de produto biológico já que a conservação é obtida sem conservantes químicos nem de síntese.

Quando procuramos desvantagens na utilização desta tecnologia podemos nomear as seguintes [9]:

- Inexistência de uma regulamentação comum a nível europeu que a tutele e a dificuldade em obter autorização para aplicação industrial;
- Possível alteração das propriedades sensoriais dos alimentos e os custos elevados de produção e desenvolvimento.

### 1.3.1 As bactérias ácido-lácticas

Ao longo dos séculos foi comum o uso de microrganismos e dos seus produtos metabólicos na conservação de alimentos. As bactérias ácido-lácticas foram empiricamente e de forma artesanal utilizadas na fermentação de leite, carne e vegetais no sentido de se obterem produtos com maior tempo de vida útil.

As bactérias ácido-lácticas incluem um grande número de microrganismos Gram-positivos não esporulados, anaeróbios, aerotolerantes e ácido tolerantes. Apresentam uma morfologia, um metabolismo e uma fisiologia muito semelhante entre si. Têm um metabolismo energético exclusivamente fermentativo, através da produção de ácido láctico a partir de hidratos de carbono. Incluem cocos do género: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e bacilos dos géneros *Lactobacillus* e *Carnobacterium* [10].

As bactérias ácido-lácticas são o grupo de bactérias mais abundante e difundido na natureza, em grande medida devido à capacidade que possuem para crescer numa variedade de substratos e numa diversidade de condições biológicas. O grupo *Lactobacillus* é o mais importante e heterogéneo (figura 1). As bactérias lácticas não necessitam de oxigénio para crescer são tolerantes à presença de dióxido de carbono, nitritos, fumo, concentrações de sal relativamente elevadas e toleram valores de pH baixos.

As bactérias ácido-lácticas fazem parte da flora microbiana típica dos produtos curados/fumados, quer pela sua presença natural quer pelo seu aporte como *starter*. As bactérias ácido-lácticas competem com outros microrganismos por nutrientes e habitats. O seu poder é conseguido em parte graças ao efeito antagonista que apresentam ao gerar substâncias antimicrobianas.

Além do papel tecnológico que lhes é reconhecido, as bactérias ácido-lácticas também são responsáveis por conferir aos produtos fermentados uma série de características sensoriais e nutricionais apreciadas pelo consumidor como é o caso da cor, do sabor, da textura, da digestibilidade e da qualidade nutricional peculiar destes produtos [11,12,13,14].

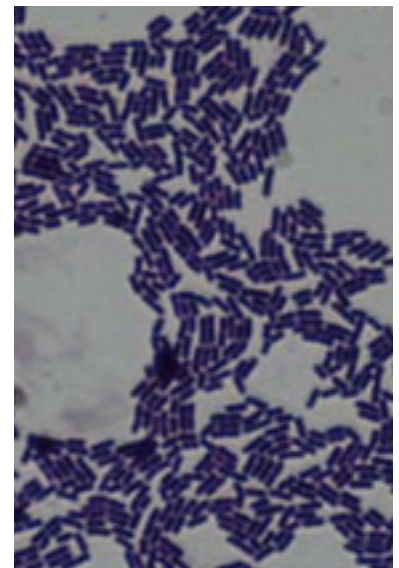
As bactérias ácido-lácticas são responsáveis pelo sabor «picante» dos enchidos e pelas pequenas quantidades de ácido acético, ácido propiónico, etanol, acetona, dióxido de carbono e ácido pirúvico que se produzem durante a fermentação. A quantidade e os tipos de compostos formados dependem do *starter* aplicado, dos hidratos de carbono do substrato, das fontes proteicas da matriz do alimento e dos aditivos utilizados [15].

A diminuição do pH resulta da formação do ácido láctico o que por si só pode ser suficiente para antagonizar muitos microrganismos, incluindo a *Listeria monocytogenes*. Os ácidos acético e propiónico atuam de uma maneira semelhante ao ácido láctico. Estes ácidos orgânicos desempenham um papel importante em alguns alimentos fermentados, e sabe-se que o ácido acético tem um efeito antimicrobiano sinérgico na presença do ácido láctico.

As bactérias lácticas, como referido anteriormente, são responsáveis por conferir aos produtos fermentados uma série de características químicas, nutricionais e sensoriais únicas, em grande medida devido aos mecanismos de sobrevivência que ativam na presença da flora microbiana competitiva. São exemplos de mecanismos de sobrevivência mais comuns a competição pelo oxigénio, a competição por sítios de ligação e a competição por produção de substâncias antagonísticas como o diacetilo, o peróxido de hidrogénio, o acetaldeído, os compostos não proteicos de baixo peso molecular como a reuterina, reuteriцина e ácido piroglutâmico e pela produção de bacteriocinas [16,17,18,19,20,21].



**A bioconservação de alimentos, através da adição de substâncias naturais, apresenta-se como uma alternativa interessante para aumentar a vida útil do produto, garantir a sua segurança microbiológica e reduzir o uso de aditivos sintéticos sem modificar as características sensoriais.**



**Figura 1:** *Lactobacillus plantarum* (microscopia ótica coloração de Gram, ampliação 10X100)

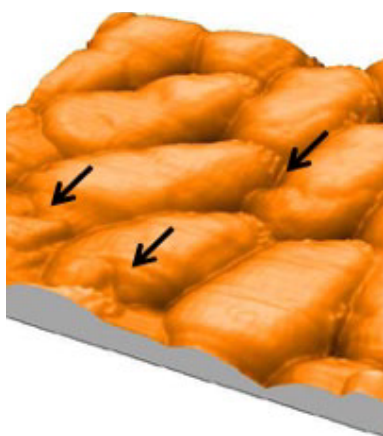


Figura 2: Visualização por microscopia de força atômica da deformação celular em *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC19119 pela ação da bacteriocina ST5Ha [45]

Nos últimos anos tem-se verificado um crescente interesse pela utilização de bactérias ácido-lácticas na conservação de alimentos. Vários estudos publicados demonstram a viabilidade destes microrganismos no controlo do crescimento de microrganismos patogénicos e contaminantes. Diversas bactérias lácticas como o *Lactobacillus acidophilus* [22], o *Lactobacillus gasseri* [23], o *Lactobacillus rhamnosus* [24], *Lactobacillus plantarum* [25,26], *Lactobacillus casei* [27] e *Lactobacillus paracasei* [28] foram citadas pela sua capacidade em inibir agentes patogéneos. Foram estudadas interações *in vitro* contra bactérias enteropatógenicas Gram-negativas, tais como *Escherichia coli* [23,27,29], *Salmonella enterica* [28,30,31], *Helicobacter pylori* [32] e *Shigella sonnei* [33]. Por outro lado foram também descritos efeitos antagónicos das bactérias lácticas frente ao crescimento de patogénicos Gram-positivos como é o caso do *Bacillus cereus* [34] e da *Listeria monocytogenes* [35].

Sabe-se hoje que estes organismos unicelulares são responsáveis pela produção de uma grande variedade de metabolitos antimicrobianos como o diacetilo (produto de fermentação), o peróxido de hidrogénio, o acetaldeído, os ácidos orgânicos, os compostos não proteicos de baixo peso molecular (reuterina, reutericiclina e ácido piroglutâmico) e as bacteriocinas, as que maior potencial apresentam para a bioconservação de alimentos [18,19,20,21]. Estes compostos sintetizam-se no ribossoma e apresentam um largo espetro de ação dependente da espécie alvo.

Na última década, foram caracterizadas e identificadas uma grande variedade de bacteriocinas (péptidos de bactérias ácido-lácticas) o que conduziu a um avanço considerável nesta linha de investigação. Diversos estudos evidenciaram as capacidades antimicrobianas de diversas bacteriocinas que foram consideradas como excelentes conservantes quando utilizadas só ou em misturas [20,36,37,38,39,40,41,42,43,44]. Na figura 2 pode visualizar-se a lise e o colapso das células da *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC19119 pela ação bactericida da bacteriocina ST5Ha produzida pela bactéria ácido-láctica *Enterococcus faecium* ST5Ha[45].

Autores como Ruiz–Moyano et al. [46] isolaram 363 estirpes de bactérias ácido-lácticas de lombo ibérico, e 30 % apresentaram um potencial tecnológico elevado para serem utilizadas como culturas probióticas face à habilidade para crescerem e desenvolverem-se adequadamente em pH ácido e em concentrações significativas de NaCl. Albano et al. [47] avaliou o potencial da bacteriocina PA-1 produzida pelo *Pediococcus acidilactici* como bioconservante na “alheira”. Esta bactéria láctica foi capaz de inibir um conjunto de estirpes de *Listeria innocua*, durante o processo de produção e ao longo do tempo de vida útil do produto, reduzindo o patogénico para níveis de deteção inferiores a 1.5 UFC/g, sem afetar o correto desenvolvimento da flora microbiana natural, nem o pH, e sem que o produto sofresse alterações organoléticas perceptíveis por um painel de provadores treinados.

Embora nalguns países a bacteriocina *pediocina* seja permitida como conservante alimentar, na União Europeia e nos EUA a única bacteriocina permitida para incorporação direta em alimentos é a *nisina*. Descoberta em 1928, a *nisina* recebeu o estatuto GRAS (Generally Regarded As Safe) em 1988, tendo sido aprovada pela US Food and Drug Administration (FDA) a sua aplicação a produtos alimentares [48]. Em 1995 foi autorizado o uso da *nisina* (E-234) em alimentos na União Europeia, pela Diretiva 95/2/EC. Atualmente a sua aplicação é regulada por meio do Regulamento 1129/2011[5].

Tal como a *nisina*, as outras bacteriocinas estudadas são rapidamente degradadas pelas proteases do trato gastrointestinal, portanto poder-se-ia ampliar o estatuto GRAS a outras bacteriocinas amplamente testadas *in vitro*, através da promoção de estudos *in vivo* [49].

### 1.3.2 Metodologias e requisitos de aplicação das bactérias ácido-lácticas

A bioconservação pode ser aplicada em alimentos, concretamente em produtos cárneos curados e/ou fumados através de 4 métodos de adição [50,51]:

1. Adição de um cultivo puro e viável de bactérias lácticas com capacidade comprovada de produção de bacteriocinas. O seu êxito depende da habilidade do cultivo para crescer e produzir estes metabolitos em condições ambientais e tecnológicas específicas (temperatura, pH, aw, aditivos e outros). A cultura deve ser capaz de competir com a microflora natural, não deve influenciar as propriedades físico-químicas e organolépticas do alimento, não produzir gás nem exopolissacarídeos para evitar o inchamento da embalagem e a formação de viscosidades.
2. Adição de bactérias lácticas mesófilas, permitindo assim salvaguardar a sua viabilidade frente a um possível abuso de temperatura durante o processo de fabrico. A estirpe bioprotetora deve ser adicionada com uma concentração inicial conhecida e em condições de refrigeração. Quando a temperatura do processo é excessiva a estirpe desenvolver-se-á por competição frente à bactéria patogénica. Pode até existir uma degradação do produto segundo a temperatura de armazenamento a que se encontra, não permitindo desta forma o crescimento do microrganismo patogénico e o consumo do produto por parte do consumidor.
3. Adição de preparações de bacteriocinas em extrato cru, licor fermentado ou concentrados obtidos a partir do crescimento das bactérias lácticas que comprovem a sua produção em extrato complexo/alimento. Esta técnica evita o uso de compostos purificados os quais podem obrigar à existência de regulação legal e a um custo de produção superior devido à necessidade de purificação do composto.
4. Adição de substâncias antagónicas puras ou semipuras como as bacteriocinas. Este método ganha especial interesse na medida que é possível ter uma noção mais precisa da dose adicionada e por isso o resultado pode ser mais fiável. Esta técnica de bioconservação está limitada à legislação existente em cada país, concretamente no que concerne à adição de aditivos. É importante, inicialmente, padronizar a produção e precipitação da bacteriocina até que seja possível garantir a sua reprodutibilidade e desta forma assegurar a quantidade adequada, cuja adição permitirá um suficiente poder de inibição.

A aplicação deste tipo de tecnologias obriga indiscutivelmente ao controlo das variáveis tecnológicas a que estes cultivos estão sujeitos. As duas primeiras técnicas de bioconservação são consideradas técnicas *in situ* visto que todo o processo se desenvolve de forma autónoma dentro do alimento. As duas últimas técnicas são consideradas técnicas de adição *ex situ* já que as culturas protetoras são produzidas em condições controladas e só depois são adicionadas ao alimento. Para que seja possível executar as técnicas *ex situ* é necessário isolar completamente os microrganismos produtores de bacteriocinas, assegurar a existência de equipamento e meios de cultura específicos, garantir a atividade de cada extrato, determinar a concentração mínima inibitória contra patogénicos (determinação de curvas de crescimento e inativação) e posteriormente padronizar a técnica para assegurar as quantidades de inóculo e o efeito desejado.



**Nos últimos anos tem-se observado um crescente interesse pela utilização de bactérias ácido-lácticas ou bacteriocinas na conservação de alimentos.**



## 2. ESTUDO DEMONSTRAÇÃO: SUBSTITUIÇÃO DE ADITIVOS SINTÉTICOS POR CULTURAS VIVAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS NUM PRODUTO CURADO/FUMADO TRADICIONAL

### 2.1 DEFINIÇÃO DO PRODUTO

Este estudo tem como base os resultados preliminares do projeto «Biofumados: Tradição vs Qualidade». A utilização de culturas de arranque, em substituição das fermentações realizadas pela flora autóctone, apresenta vantagens, por exemplo, em termos do aumento da consistência do inóculo, do risco reduzido de contaminação cruzada, da uniformidade na produção de ácido láctico, da produção de aromas desejáveis, da previsão do valor final de pH e da diminuição do risco de crescimento de bactérias patogénicas. Outros benefícios incluem a aceleração do tempo de fermentação, o aumento da produtividade, e a redução de produtos com defeitos de sabor e textura, atribuídos ao desenvolvimento de bactérias homofermentativas.

Assim, este projeto visa a produção de enchidos e fumados tradicionais, mais seguros, através da utilização de microrganismos autóctones, isolados desses mesmos enchidos, e das suas bacteriocinas. A utilização de microrganismos com elevado valor tecnológico e que simultaneamente possa gerar *in situ* condições adversas ao crescimento de patogénicos é sem dúvida uma linha inovadora no setor dos enchidos e fumados tradicionais e que este projeto protagoniza.

Pretende-se ainda, selecionar o método mais adequado de adição de culturas de arranque bioprotetoras e das suas bacteriocinas no processamento de enchidos tradicionais curados e/ou fumados, quer por incorporação direta no produto quer na embalagem. O método de adição selecionado será aquele que demonstrar possuir o maior equilíbrio capacidade conservante/manutenção das características organolépticas destes produtos tradicionais. Para este estudo foi selecionado um enchido tradicional do Nordeste português – Alheira.



Figura 3: Alheira

A Alheira é um enchido tradicional português, cozido, curado e levemente fumado. A sua origem remonta a finais do século XV e associa-se à presença das comunidades judias na região de Trás-os-Montes no Norte de Portugal [52]. É um produto constituído por uma mistura de carne de vaca, frango, porco, pão e condimentos. Apresenta uma cor castanho-clara e uma forma cilíndrica recordando uma ferradura com cerca de 20 a 25 cm comprimento (figura 3). A tripa deve apresentar-se sem ruturas e bem ligada à massa. As extremidades unem-se por fio de algodão [52]. É um produto alimentar que necessita uma regeneração antes de ser consumido a qual pode ser feita por fritura em óleo ou no forno. O produto apresenta uma vida útil de 60 dias, armazenado a uma temperatura entre 0 e 5°C e embalado em atmosfera modificada (80 % N<sub>2</sub> e 20 % CO<sub>2</sub>). O seu peso oscila entre 150 e 200 gramas. Relativamente às características sensoriais, apresenta um sabor leve a fumo, agradável, destacando-se o sabor a alho, azeite e uma ligeira acidez típica.

|                              | Mínimo | Máximo | Média | Desvio Padrão |
|------------------------------|--------|--------|-------|---------------|
| <b>pH</b>                    | 4,5    | 6,3    | 5,1   | 0,5           |
| <b>% NaCl</b>                | 1,0    | 1,8    | 1,3   | 0,3           |
| <b>% Humidade</b>            | 43,3   | 57,2   | 52,3  | 4,3           |
| <b>% Gordura</b>             | 10,9   | 29,6   | 18,4  | 4,7           |
| <b>% Proteína Total</b>      | 6,9    | 15,5   | 11,4  | 2,8           |
| <b>% Hidratos de carbono</b> | 10,2   | 20,9   | 15,2  | 3,6           |
| <b>Energia (kcal/100 g)</b>  | 220    | 369    | 274,4 | 39,7          |

*Tabela 1: Mínimo, máximo, média e desvio padrão de alguns parâmetros físico-químicos e nutricionais da alheira. Tabela adaptada de Ferreira et al., [53]*

## 2.2 OBJETIVOS

Este projeto está assente em várias etapas e visa:

1. Desenvolver estudos preliminares e levantamento de patentes em produtos cárneos curados e fumados;

Realização do levantamento da informação relativa a patentes já existentes no mercado internacional sobre bioconservação em produtos de carne enchidos e fumados e que servirão posteriormente de suporte para o desenvolvimento e inovação previstos nas tarefas subseqüentes.

2. Desenvolver um levantamento dos perigos potenciais durante o processamento de produtos de carne tradicionais portugueses e validação de fluxogramas *in locu*;

Validação do fluxograma de produção de produtos enchidos e fumados e a posterior identificação das variáveis de processo e perigos potenciais de forma a identificar as etapas do processamento em que a utilização de agentes bioprotetores poderá representar uma mais-valia para a qualidade e segurança do produto final.

3. Isolar e selecionar as culturas de arranque bacteriocinogénicas a aplicar como bioprotetores no processamento de produtos enchidos e fumados tradicionais portugueses;

Isolamento das diferentes bactérias ácido-lácticas e realização de análises de atividade antimicrobiana e bacteriocinogénica nos diversos produtos contra várias bactérias patogénicas de acordo com os perigos identificados na etapa nº 2. Teve-se em conta aspetos como a ausência de fatores intrínsecos de virulência; os produtos de origem; a resistência às condições do processo nomeadamente ao pH, à temperatura, ao sal e a componentes da matriz alimentar.

4. Avaliar os parâmetros de qualidade dos produtos representativos da tecnologia aplicada;

Caracterização dos produtos enchidos e fumados ao longo do seu tempo de vida útil, produzidos com e sem a adição de culturas de arranque bioprotetoras o que permitiu avaliar o impacto da tecnologia na qualidade final do produto. Para esta caracterização recorreu-se a técnicas de análise físico-química, microbiológica e sensorial de alimentos.

Posteriormente será estudado um método inovador de adição das culturas bioprotetoras que poderá ocorrer durante a fase de preparação e repouso da massa, imediatamente antes do enchimento e no final do processo, por imersão ou aspersão. No caso de produtos laminados será ainda avaliada a adição de culturas por aspersão, pincelagem e imersão antes do fecho da embalagem. Serão conduzidos estudos para avaliar o impacto de diferentes tecnologias de embalagem isoladas e em combinação de forma a desenvolver uma embalagem otimizada para cada tipo de produto e respetiva forma de apresentação (à peça ou fatiado), que mantenha a qualidade e segurança do produto, alargando, se possível,



**Neste estudo foi avaliada a vida útil de enchidos fumados produzidos com e sem a adição de starters bioprotetores.**



o seu tempo de vida. As tecnologias em avaliação serão as embalagens e/ou revestimentos bioativos impregnados com antimicrobianos, a embalagem em atmosfera modificada e a embalagem sob vácuo. Por fim será desenvolvida uma aplicação das culturas de arranque bioprotetoras à escala industrial (*scale-up*) no sentido de validar a tecnologia e disponibilizá-la à indústria.

Os resultados apresentados no subcapítulo seguinte focam somente a adição de culturas de arranque bioprotetoras *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus sakei*, isolados de produtos curados/fumados tradicionais, respetivamente “Beloura” e “Salpicão”, no processo de fabrico de outro enchido tradicional, a Alheira.

## 2.3 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

No âmbito da etapa nº 3 do projeto, mencionada anteriormente, - Isolar e selecionar as culturas de arranque bacteriocinogénicas a aplicar como bioprotetores no processamento de produtos enchidos e fumados tradicionais portugueses - foram desenvolvidos vários ensaios cujas técnicas e resultados se apresentam no capítulo seguinte.

Foram realizados ensaios de isolamento de bactérias ácido-lácticas em produtos cárneos curados e fumados. Foram isoladas 6 estirpes, 2 de *Lactobacillus plantarum*, 3 de *Lactobacillus sakei* e 1 de *Enterococcus faecium* com capacidade bacteriocinogénica. Foram publicados resultados de otimização e produção de bacteriocinas por várias destas estirpes, concretamente sobre otimização da produção da bacteriocina ST153ch produzida pela estirpe *Lactobacillus sakei* e isoladas de “salpicão” [36] e o *Lactobacillus plantarum* e a sua bacteriocina ST202ch isolado de “beloura” [54], ambos produtos à base de carne curados e fumados.

Depois dos estudos de isolamento e seleção das culturas com base no seu poder antimicrobiano procedeu-se à sua aplicação à escala industrial na empresa Minhofumeiro – Enchidos e Fumados à Moda de Ponte de Lima Lda. Foi incorporada no processo de fabrico de Alheira a estirpe que melhores resultados apresentou, o *Lactobacillus sakei* ST153ch. Depois da incorporação da cultura na mistura de carnes prosseguiu-se o normal processo de fabrico, nas suas várias etapas até ao produto final embalado a vácuo e/em atmosfera modificada. O produto foi submetido a condições idênticas de cura, fumagem, embalagem e temperatura de armazenamento. Após o embalamento foi feita a expedição para as unidades laboratoriais de microbiologia e análise sensorial onde foram avaliadas a atividade antimicrobiana e as características sensoriais do produto tratado por comparação com o produto *standard*.

Em simultâneo foram desenvolvidas análises sensoriais por um painel de 9 provadores treinados para a prova e deteção de defeitos em produtos curados e fumados à base carne. Foram desenvolvidas sessões prévias para discussão conjunta dos atributos sensoriais de maior relevo, das escalas, dos limites e das âncoras verbais. Posteriormente procedeu-se ao desenvolvimento da “ficha de prova” composta por 17 descritores sensoriais.

Foi desenvolvida uma análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* Statistica (version7, Statsoft, Inc) com o objetivo de comparar e perceber quais os atributos, avaliados pelo painel, que apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre os dois tipos de produtos o controlo (amostra comercial) e a “alheira” com a estirpe adicionada, para o dia 0. Posteriormente efetuaram-se estudos a 30, 45, 60 e 90 dias com o objetivo de perceber se o efeito bactericida se mantém ao longo do tempo de vida útil destes produtos (60 dias) sem alterações significativas a nível sensorial e/ou se eventualmente poderemos prolongar este tempo, como é outro dos objetivos deste projeto. Por último, será realizado um estudo ao consumidor no sentido de avaliar a aceitabilidade do novo produto.

## 2.4 RESULTADOS

Foi evidenciada a actividade antimicrobiana e bacteriocinogénica do *Lactobacillus plantarum* produtor da bacteriocina ST202ch e de *Lactobacillus sakei* produtor da bacteriocina ST153ch frente a *Listeria monocytogenes* B296. Foram realizados estudos que permitiram comparar a eficiência e o crescimento das bactérias ácido-lácticas directamente na “alheira” e em competição com outros microrganismos para simular as condições reais do produto e da sua flora microbiana. Foi demonstrado a capacidade de crescimento das bactérias lácticas alvo de estudo inoculadas com diferentes microrganismos. Posteriormente foi desenvolvido um estudo preliminar em ambiente industrial com a produção de alheiras inoculadas com *Lactobacillus sakei* produtor da bacteriocina ST153ch.

Das bactérias ácido-lácticas isoladas identificaram-se estirpes com actividade antimicrobiana e bacteriocinogénicas como já foi referido. No rastreio realizado constatou-se que esta actividade foi devida à competição directa entre espécies ou ao efeito da produção de ácido láctico com conseqüente redução do pH do meio de cultura.

Como já mencionado anteriormente, só duas estirpes autóctones bacteriocinogénicas, o *Lactobacillus plantarum* ST202ch isolado de “beloura” e o *Lactobacillus sakei* ST153ch isolado de “salpicão” foram posteriormente utilizadas. A actividade antilisteria, das estirpes *Lactobacillus plantarum* produtora da bacteriocina ST202ch e da *Lactobacillus sakei* produtora da bacteriocina ST153ch, foi inicialmente avaliada em amostras de carne de porco esterilizada dado não ser conhecido o seu comportamento *in situ*.

Observou-se uma inibição de *L. monocytogenes* na presença de ST 153ch (halo de inibição - figura 4) ao longo dos 10 dias de estudo, a uma temperatura de incubação de 30 °C. Não se observou inibição do patogénico indicador com a ST202ch ao longo do tempo de estudo, contudo observou-se um aumento do período de latência (24 horas) (figura 5).

Estes resultados evidenciam que a estirpe *Lactobacillus sakei*, produtora da bacteriocina ST153ch, foi mais efetiva no controlo do crescimento do microrganismo indicador, *Listeria monocytogenes* B296, que a estirpe *Lactobacillus plantarum* ST202ch.

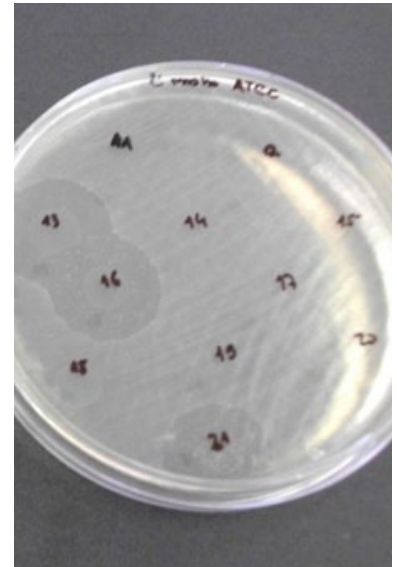


Figura 4: Placa com halos de inibição pela ação do *Lactobacillus sakei* ST153ch frente a *L. monocytogenes*

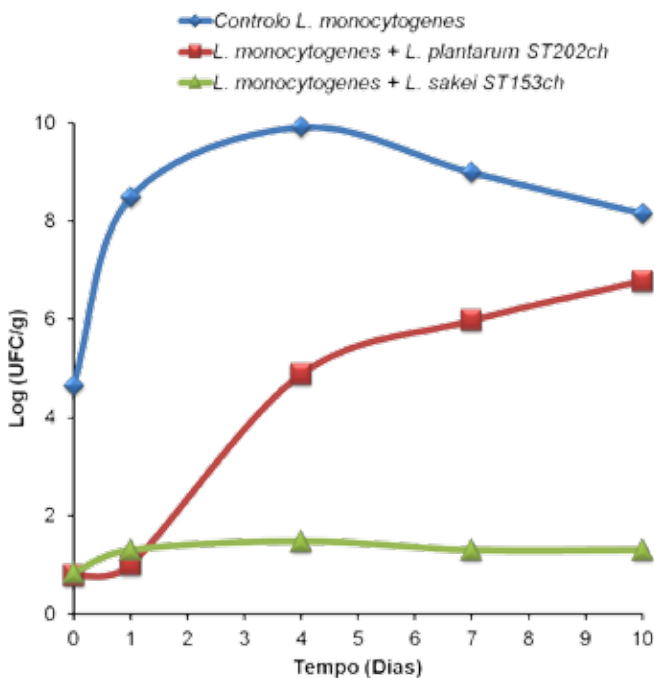


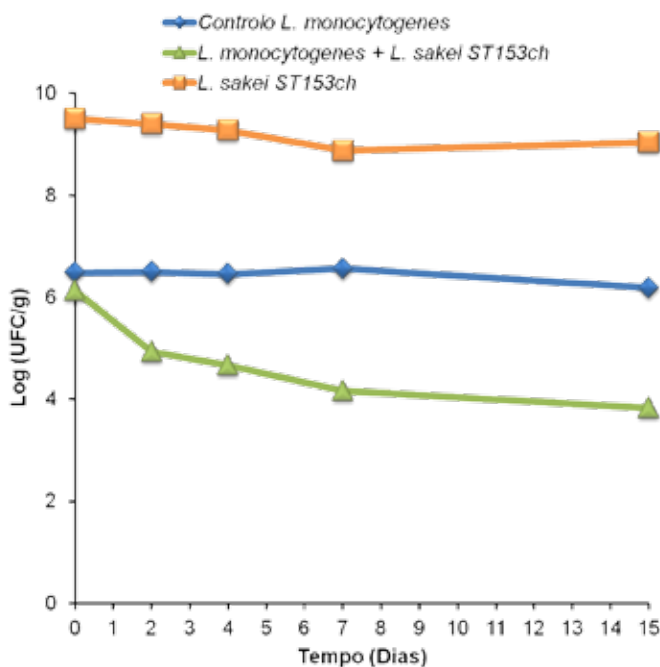
Figura 5: Contagens de *L. monocytogenes* em carne esterilizada na presença de ST202ch (*L. plantarum* ST202ch) e de ST153ch (*L. sakei* ST153ch) (Controlo *L. monocytogenes* – crescimento de *L. monocytogenes* na carne; *L. monocytogenes* + *L. plantarum* ST202ch – crescimento de *L. monocytogenes* na carne com mistura de ST202ch; *L. monocytogenes* + *L. sakei* ST153ch – crescimento de *L. monocytogenes* na carne com mistura de ST153ch)

Tal como se pode verificar no figura 6 o *Lactobacillus sakei* ST153ch inibiu o crescimento da *L. monocytogenes*, com uma redução de 2 ciclos logarítmicos face ao controlo ao longo dos 15 dias de armazenamento e a uma temperatura de refrigeração de 5°C.

A análise sensorial, realizada no dia 0, revelou que o painel de 9 provadores foi coerente na resposta ( $p > 5\%$ ) para os atributos que apresentaram diferenças significativas, o “Cheiro Característico” a “Dureza da Massa” o “Sabor Característico”, o “Sabor Ácido” e o “Sabor Amargo” ( $p < 5\%$ ). Isto quer dizer que o painel apresentou diferenças significativas na perceção destes atributos comparando a alheira inoculada e a alheira comercial não inoculada.

Não foram encontradas diferenças significativas na alheira inoculada embalada a vácuo e em atmosfera modificada (80% N<sub>2</sub> e 20% CO<sub>2</sub>) para todos os atributos analisados. A análise posterior dos produtos ao longo de tempo de vida permitirá avaliar se a embalagem afeta ou não significativamente a perceção sensorial de algum dos atributos referidos.

A adição de uma suspensão salina de 500 ml por cada 10 kg de massa inoculada, que provavelmente acidificou a amostra pela produção de mais ácido láctico, aumentou também a humidade do produto e alterou a sua textura, e estas duas condições são, certamente, responsáveis por esta perceção sensorial influenciando na dureza, no cheiro e no sabor percebido pelo painel. Posteriormente será averiguada esta influência pela comparação com um produto controlo ao qual se adicionará 500 ml de solução salina sem o inóculo. Serão também efetuados outros estudos de adição do inóculo, quer na massa quer na embalagem. Estas análises sensoriais vão permitir perceber se diferentes tipos de embalagem em atmosfera modificada (uso comercial) e vácuo influenciam as características sensoriais do produto ao longo do tempo de vida útil, e aos 90 dias, quer no grupo controlo (amostra comercial), quer no grupo com a cultura adicionada.



**Figura 6:** Contagens de *L. monocytogenes* na alheira na presença do *L. sakei* ST153ch (Controlo *L. monocytogenes* – crescimento de *L. monocytogenes* em alheira; *L. monocytogenes* + *L. sakei* ST153ch – crescimento de *L. monocytogenes* em alheira com mistura de ST153ch; *L. sakei* ST153ch – crescimento do *L. sakei* ST153ch em alheira)

### 3. CONCLUSÕES

À semelhança do que foi desenvolvido neste trabalho vários autores demonstraram o poder das bactérias ácido-lácticas para inibir o crescimento de microrganismos patogénicos em produtos à base de carne curados e fumados [47,54,55,56].

No futuro este tipo de “culturas funcionais” poderão proteger o consumidor de intoxicações alimentares por estirpes patogénicas ou pela ingestão das suas toxinas, através de uma rápida acidificação do alimento ou através da produção de metabolitos antimicrobianos como as bacteriocinas [49]. No entanto, é importante que, quando se desenvolverem testes para determinar a capacidade antimicrobiana de novas estirpes, se tenham em conta os riscos associados, como a formação de aminas biogénicas e o desenvolvimento de resistências por parte das bactérias a antibióticos [49]. Certas estirpes especialmente selecionadas podem até apresentar benefícios probióticos se forem corretamente modificadas, podendo até mesmo ser denominadas como portadoras de características nutracêuticas [55].

Tal como Bonomo et al., [57] foi possível demonstrar com este estudo a alta capacidade antimicrobiana do *Lactobacillus sakei* no sentido de padronizar o processo, preservar as características organolépticas e sensoriais, e até mesmo melhorá-las, no sentido da não utilização de conservantes sintéticos, substituindo-os por culturas vivas autóctones capazes de garantir os produtos em termos microbiológicos e salvaguardando simultaneamente a segurança química. Esta transferência de tecnologia e inovação dos produtores de conhecimento à indústria, neste caso tradicional, demonstra que a bioconservação através da adição de bactérias ácido-lácticas é uma alternativa viável aos aditivos sintéticos garantindo a segurança química e microbiológica do produto, mas mantendo as suas características organolépticas e o seu modo de produção tradicional, sendo um exemplo do que temos vindo a designar de «Inovar na Tradição».

As bacteriocinas são metabolitos secundários facilmente degradados pelas proteases enzimas do trato gastrointestinal humano [42], e por isso, à semelhança da *nisina*, o conjunto de substâncias GRAS deveria ser alargado numa perspetiva de dar uma maior oportunidade à bioconservação quer por adição de Bactérias Ácido-lácticas, quer por adição direta das suas bacteriocinas, sempre que existam provas e estudos específicos *in vivo* que assegurem os seus benefícios [49].

### 4. AGRADECIMENTOS

Ao Programa COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade do Governo de Portugal pelo financiamento do projeto nº 13338 Biofumados: Tradição vs Qualidade, e à empresa promotora, Minhofumeiro – Enchidos e Fumados à Moda de Ponte de Lima Lda., ao Instituto Politécnico de Viana do Castelo e à Universidade Católica Portuguesa. Os estudos aqui apresentados são o resultado do trabalho de diversos investigadores das duas últimas instituições e também da colaboração do Dr. Svetoslav Todorov, da Universidade de S. Paulo, Brasil.

Ao Fundo FEDER (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional) através do programa de cooperação inter-regional do espaço sudoeste europeu (Interreg SUDOE IVB) e ao conjunto dos sócios do projeto FOODSME-HOP, que tornaram possível a publicação deste documento técnico destinado às empresas agroalimentares.



**A bioconservação através da adição de bactérias ácido-lácticas é um alternativa viável aos conservantes sintéticos que garante a segurança biótica e abiótica do produto mantendo as suas características sensoriais.**



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Vaz-Velho M. Smoked foods production. Em: Caballero B, Trugo L, Finglas PM, editores. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier-Academic Press; 2003. p. 5302-9.
- Ribeiro M, Martins, C. La certificación como estrategia de valorización de productos agroalimentarios tradicionales: la alheira, un embutido tradicional de Trás-os-Montes. *Agricultura y Sociedad* 1996;80-81:313-34.
- Caldentey P, Gómez, A. Productos típicos, territorio y competitividad. *Agricultura y Sociedad* 1996;80-81:57-82.
- Soeiro A. Estratégias para a valorização dos produtos tradicionais portugueses: o caso particular das protecções das denominações de origem, das indicações geográficas e dos nomes específicos. 1as Jornadas de Queijos e Enchidos; 3 de abril de 1998; Porto, Portugal. p. 19-22.
- Reglamento (UE) N.º 1129/2011 da Comissão, de 11 de novembro de 2011, que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. JOUE L295 (12 novembro 2011).
- Reglamento (CE) N.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, sobre aditivos alimentares. JOUE L354 (31 dezembro 2008) [Internet]. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:pt:PDF>
- Freitas AC, Figueiredo P. Inibidores de Alterações químicas e Biológicas. Em: *Conservação de Alimentos*. Lisboa; 2000. p. 50-2.
- Wirth F. La reducción y el no empleo de las sustancias de curado en los productos cárnicos. *Fleischwirtsch* 1993;1:3-9.
- Freire R. Informe Bioconservação de Alimentos. Proyecto Bioemprende, financiado por el programa POCTEP (Programa de Cooperação Transfronteiriça Espanha-Portugal 2007-2013). Ferrol: 2010. p. 7.
- Santoch VD. Evaluación de la calidad y composición química de la carne de res proveniente de animales de dos grupos de edad en Puerto Rico [tesis Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos]. Recinto universitario de Mayagüez (Puerto Rico): Univ Puerto Rico; 2006.
- Daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol* 1989;43:164-7.
- Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 1988;70:337-49.
- Schillinger U, Lücke FK. Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. *Fleischwirtsch* 1990;70:1296-9.
- Smith JL, Palumbo SA. Use of starter cultures in meat. *J Food Prot* 1983;46:997-1006.
- Aymerich T, Martín B, Garriga M, Hugas, M. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4583-94.
- García T, Martín R, Sanz B, Hernández, PE. Extensión de la vida útil de la carne fresca. En: *Envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias acidolácticas y bacteriocinas*. Rev Española de Ciencia y Tecnología 1995;35(1):1-18.
- Vignolo G, Fadda S, Kairuz MN, Holgado AR, Oliver G. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by lactocina 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705. *Int J Food Microbiol* 1996;29:397-402.
- Chen H, Hoover DG. Bacteriocins and their food applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2003;22:82-100.
- Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 2004;15:67-78.
- Gálvez A, Abriouel H, Lucas López R, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 2007;120:51-70.
- Bello BD, Rantsiou K, Belliob A, Zeppaa G, Ambrosolia R, Civerab T et al. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT Food Sci Technol* 2010;43:1151-9.
- Sheman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PSC, Goulet J, Tomkins TA. Probiotics Reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and Enteropathogenic *E. coli* O127:H6-Induced Changes in Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers by Reducing Bacterial Adhesion and Cytoskeletal Rearrangements. *Infect Immun* 2005;73(8):5183-8.
- Fernández MF, Boris S, Barbés C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J App Microbiol* 2003;94(3):449-55.
- Lee Y-K, Puong K-Y, Ouwehand AC, Salminen SJ. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J Med Microbiol* 2003;52:925-30.
- Hugo AA, Kakisu E, De Antoni GL, Pérez PF. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Lett. J Appl Microbiol* 2008;46(6):613-9.
- Ramiah K, Van Reenen CA, Dicks LMT. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Res Microbiol* 2008;159:470-5.
- Ingrassia I, Leplingard A, Darfeuille-Michaud A. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(6):2880-7.
- Jankowska A, Laubit D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *J Biomed Biotechnol* 2008; Artigo ID: 357964, 6 páginas.
- Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties,

- competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol* 2008;125:286-92.
30. Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Protective action of *Lactobacillus* kefir carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int J Food Microbiol* 2007;118:264-73.
  31. Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int Dairy J* 2006;16:189-99.
  32. Collado MC, González A, González R, Hernández M, Ferrús MA, Sanz Y. Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25:385-91.
  33. Spinler JK, Taweechoitapat M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 2008;14:166-71.
  34. Yang Y, Tao W-Y, Liu Y-J, Zhu F. Inhibition of *Bacillus cereus* by lactic acid bacteria starter cultures in rice fermentation. *Food Control* 2008;19:159-61.
  35. Ghalfi H, Thonart P, Benkerroum N. Inhibitory activity of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 against *Listeria monocytogenes* and ST2-verotoxin producing *Escherichia coli* O157. *Afr J Biotechnol* 2006;22:2303-6.
  36. Todorov SD, Ho P, Vaz-Velho M. Optimisation of bacteriocin ST153Ch production by *Lactobacillus sakei* ST153Ch, strain isolated from salpicão, a traditional pork product from the north-west of Portugal. *J Biotechnol* [Internet] 2008;1(136):S735. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1752>
  37. Todorov SD, Vaz-Velho M. Isolation and characterization of plantaricin ST8SH a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH, strain isolated from Bulgarian salami. *J Biotechnol Supplement* [Internet];1(136):S735. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1751>
  38. Todorov SD, Ho P, Franco BDGM, Vaz-Velho M. Effect of medium composition on the production of bacteriocin ST216Ch a strain of *Lactobacillus plantarum* isolated from Portuguese Chouriço. *Higiene Alimentar* 2009;23(170-171):352-3.
  39. Todorov SD, Dicks LMT. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram negative bacteria. *Enz Microbial Tech* 2005;36:318-26.
  40. Gyoil SH, Min CY, Kyoung KH, Chul RY, Hoon LS, Chul KB. Tenderization and fragmentation of myofibrillar proteins in bovine longissimus dorsi muscle using proteolytic extract from *Sarcodon aspratus*. *LWT Food Sci Technol* 2008;41:1389-95.
  41. Oliete B, Moreno T, Carballo JA, Monserrat L, Sánchez L. Estudio de la calidad de la carne de ternera de raza Rubia Gallega a lo largo de la maduración al vacío. *Arch Zootecnia* 2006;55(209):3-14.
  42. Holzapfel WH, Geisen R, Schillinger U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol* 1995;24(3):343-62.
  43. Rybka-Rodgers S. Improvement of food safety design of cook-chill foods. *Food Res Int* 2001;34(5):449-55.
  44. Vignolo G, Fadda S. Starter cultures: Bioprotective cultures. En: Toldrá F, Hui Y, Astiasarán I, Nip W, Sebranek J, Silveira E et al, editores. *Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing; 2007. p. 147-57.
  45. Todorov SD, Franco BDGM, Tome E, Vaz-Velho M. Mode of action of bacteriocin ST5Ha on *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC19119. CIBIA VII. Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Integrando la Ingeniería de Alimentos con el Bienestar; 6-9 de setembro 2009, Bogotá, Colombia. Comunicación oral. Book of Abstracts, Programa, Sección Biopreservación.
  46. Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito MJ, Nevado FP, Córdoba M de G. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Sci* 2008;80:715-21.
  47. Albano H, Pinho C, Leite D, Barbosa J, Silva J, Carneiro L et al. Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for Alheira a fermented meat sausage. *Food Control* 2009;20:764-70.
  48. Sindt, RH, attorney. GRAS notice-exemption claim for specified uses of nisin [Internet]. Diciembre 2000 [citado 27 julho 2012]. Disponível em: [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras\\_notices/grno065.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grno065.pdf)
  49. Todorov SD, Franco BDGM, Vaz-Velho M. Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria From and for Production of Salami-like Products. *International Review of Food Science and Technology* 2009;57-61.
  50. Vásquez SM, Héctor SM, Sandra ZB. Use of Antimicrobial Substances Produced by Acid Lactic Bacterias on Meat Conservation. *Rev Chil Nutr* 2009;36(1):64-71.
  51. Moreira Do S, Wagner L. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *pediococcus* sp 347 de origen cárnico [tesis doctoral]. Madrid, España: Departamento de Nutrición y Bromatología III, Univ Complutense de Madrid, Facultad de veterinaria; 1993.
  52. Câmara Municipal de Mirandela [Internet]. Mirandela (Portugal): Câmara Municipal de Mirandela; 2012 [citado 22 de junho de 2012]. Disponível em: [www.cm-mirandela.pt](http://www.cm-mirandela.pt)
  53. Ferreira V, Barbosa J, Vendeiro S, Mota A, Silva F, Monteiro MJ et al. Chemical and microbiological characterization of alheira: A typical Portuguese fermented sausage with particular reference to factors relating to food safety. *Meat Sci* 2006;73:570-5.
  54. Todorov SD, Ho P, Vaz-Velho M, Dicks LMT. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Sci* 2010;84:334-43.
  55. Ammor MS, Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An up-date. *Meat Sci* 2007;76:138-46.
  56. Urso R, Rantsiou K, Cantoni C, Comi G, Cocolin L. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermentation sausages production. *Int J Food Microbiol* 2006;110:232-9.
  57. Bonomo MG, Ricciardi A, Zotta T, Parente E, Salzano G. Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Sci* 2008;80:1328-48.